

耐碳青霉烯大肠埃希菌分子特征和同源性分析

黄家祥^{1,2}, 王中新¹, 潘亚萍¹, 徐元宏¹

摘要 目的 研究耐碳青霉烯大肠埃希菌(CREC)的耐药特点、碳青霉烯酶基因型,并分析CREC的同源性。方法 收集安徽医科大学第一附属医院临床标本分离的6 092株大肠埃希菌,筛选出71株CREC,采用Vitek-2 Compact进行鉴定和药敏试验,改良Hodge试验(MHT)、改良碳青霉烯类灭活法(mCIM)和Carba NP试验进行碳青霉烯酶的表型确证。聚合酶链反应(PCR)检测bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{VIM}、bla_{IMP}等碳青霉烯酶基因,将阳性菌株扩增产物进行测序,测序结果在Blast程序中进行比对。用肠杆菌科基因间重复一致序列PCR(ERIC-PCR)指纹图谱确定CREC不同菌株之间的克隆关系。结果 CREC主要分布在重症监护室(ICU)和烧伤科,标本来源以尿液为主。药敏结果显示CREC对环丙沙星、左氧氟沙星和复方新诺明的耐药率都在70%以上,仅对阿米卡星和妥布霉素的耐药率低于50%。71株CREC中MHT、mCIM和Carba NP实验阳性的菌株数分别为45株、67株和69株,阳性率分别为63.38%、94.37%、97.18%。43株CREC检出碳青霉烯酶基因,34株(79.07%,34/43)携带bla_{NDM} 9株(20.93%,9/43)携带bla_{KPC-2}。另外,携带bla_{NDM}的菌株中bla_{NDM-1}占20.59%(7/34),bla_{NDM-5}占79.41%(27/34),未检出bla_{IMP}、bla_{VIM}和bla_{OXA-48}等碳青霉烯酶基因。依据ERIC-PCR指纹图谱,CREC被分为A-S共19种基因型,未发现优势基因型。结论 本院临床分离的CREC耐药率较高,呈现多重耐药现象,CREC主要携带的碳青霉烯酶基因是bla_{NDM},本院流行的CREC具有较高的遗传多样性,同源性分散。

关键词 大肠埃希菌; 碳青霉烯酶; 同源性; 分子特征

中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)04-0574-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.04.013

大肠埃希菌是引起医院和社区感染的主要病原体之一,通常作为人类和动物肠道正常菌群存在,但

是在某些情况下,可引起人类肠道感染,还可侵入肠外组织引起尿路感染、腹腔感染、胆道感染、肺部感染、血流感染、脑部感染和肌肉结缔组织感染等^[1]。近年来随着碳青霉烯类药物的广泛使用,耐碳青霉烯大肠埃希菌(carbapenem-resistant *Escherichia Coli*, CREC)已屡见不鲜。为了更好了解CREC耐药情况,预防耐药菌株院内传播,本研究收集安徽医科大学第一附属医院近5年的大肠埃希菌,从中筛选出碳青霉烯耐药的菌株,探讨CREC产碳青霉烯酶的表型、产酶基因的构成及其分子流行病学。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集安徽医科大学第一附属医院2015年1月-2019年12月临床标本分离并-20℃保存的6 092株大肠埃希菌,选取对厄他培南、亚胺培南或美罗培南耐药的菌株,转种血琼脂培养基复苏细菌,剔除重复分离株和死亡株,共71株CREC纳入本次研究。质控菌株:大肠埃希菌ATCC 25922、肺炎克雷伯菌ATCC BAA1705、肺炎克雷伯菌ATCC BAA1706。

1.2 仪器与试剂 Vitek-2 Compact微生物鉴定仪、MALDI-TOF-MS质谱仪、血琼脂培养基、MH琼脂培养基(法国Bio Merieux公司),PCR扩增仪、凝胶成像系统、电泳仪(美国BIO-RAD公司),高速离心机(德国Eppendorf公司),生物安全柜(苏净安泰空气技术有限公司),亚胺培南西司他丁钠[默沙东(中国)有限公司],琼脂糖(德国Biofrox公司),硫酸锌、酚红(中国医药集团有限公司),Taq PCR Mix预混液(2×,含红染料)、引物、4S Red Plus核酸染料、TBE粉末、DNA分子量标准Marker(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.3 细菌鉴定与药敏 采用Vitek-2 Compact进行细菌鉴定,MALDI-TOF-MS质谱仪进行确认。细菌药敏实验采用Vitek-2 Compact配套药敏卡AST-N334纸片法进行复核和补充。

1.4 耐碳青霉烯酶表型实验

1.4.1 改良Hodge实验 用无菌生理盐水制备0.5麦氏浓度的大肠埃希菌ATCC 25922菌悬液,将

2022-03-07 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2015A337)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

² 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)检验科,合肥 230001

作者简介: 黄家祥,男,主管技师,硕士研究生;

王中新,男,副教授,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: aywzhx87@163.com

菌悬液用生理盐水按 1 : 10 稀释后, 无菌棉签蘸取稀释后的菌液, 均匀涂布于 MH 琼脂平板上, 自然干燥 5 ~ 10 min, 平板中央贴美罗培南 (10 μ g) 纸片, 用一次性无菌 1 μ l 接种环挑取适量过夜培养的待测菌落, 沿美罗培南纸片边缘, 垂直方向画待测菌线, 菌线长 20 ~ 25 mm, 空气环境中 35 $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h, 结果判读: 待测菌线与抑菌圈交界处大肠埃希菌 ATCC 25922 呈增强生长, 判为阳性结果; 无增强生长, 则为阴性结果。

1.4.2 mCIM 实验 用 10 μ l 接种环刮取 1 环血琼脂平板过夜培养的待测细菌加入含 400 μ l 无菌水的 EP 管中, 震荡混匀, 浸入美罗培南纸片 (10 μ g), 35 $^{\circ}$ C 温育 2 h。取出纸片, 挤出多余菌液, 贴于均匀涂布有 0.5 麦氏浓度大肠埃希菌 ATCC 25922 菌液的 MH 琼脂上, 35 $^{\circ}$ C 温育 18 ~ 24 h, 测量抑菌圈直径。结果判读: ① 抑菌圈直径为 6 ~ 15 mm 或直径为 16 ~ 18 mm 但抑菌圈内有散在菌落生长, 提示待测菌株产碳青霉烯酶。② 抑菌圈直径 \geq 19 mm, 提示待测菌株不产碳青霉烯酶。③ 抑菌圈直径为 16 ~ 18 mm 或直径为 \geq 19 mm 但抑菌圈内有散在菌落生长, 提示无法判断是否存在碳青霉烯酶。

1.4.3 Carba NP 实验 取 a、b 两个无菌 EP 管, 均加入 100 μ l 细菌蛋白提取液, 用 1 μ l 接种环取两环血平板上培养过夜的待测菌单菌落分别加入 a、b 管中, 涡旋震荡 5 ~ 10 s, 再向 a 管中加入 A 液 100 μ l, 向 b 管中加入 B 液 100 μ l, 35 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 每 0.5 h 观察记录管中颜色变化。结果判读: ① a、b 管均为红色或橙红色, 提示未检出碳青霉烯酶。② a 管红色或橙红色, b 管浅橙色、黄色或深黄色, 提示检出碳青霉烯酶。③ a 管红色或橙红色, b 管橙色, 提示试验结果无效。④ a 管橙色、黄色或深黄色, b 管任何颜色, 提示试验结果无效。

1.5 PCR 扩增耐药基因 参照文献设计碳青霉烯酶基因引物, 并由上海生工公司合成, 引物序列见表 1。采用煮沸法制备扩增模板。PCR 反应体系总体积为 50 μ l: Taq PCR Master Mix (2 \times red dye) 25 μ l, 10 μ mol/L 正反引物各 2 μ l、DNA 模板 1 μ l、ddH₂O 20 μ l。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、根据各引物退火温度退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min、72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min、39 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像系统观察结果。阳性扩增产物委托上海生工公司进行测序, 使用 NCBI 网站的 Blast 程序对基因序列进行比对, 以确定基因型及其亚型。

表 1 PCR 引物序列

目的基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)	参考文献
bla _{KPC}	F: ATGTCAGTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	[2]
bla _{BIC}	F: TATGCAGCTCCTTTAAGGGC R: TCATTGGCGGTGCCGTACAC	537	[3]
bla _{NDM}	F: CACCTCATGTTTGAATTCGCC R: CTCTGTCACATCGAAATCGC	951	[2]
bla _{VIM}	F: GATGGTGTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390	[3]
bla _{IMP}	F: TCACATTTCATAGCGACAG R: AGTGCTACTTTTTTGTCTTTCAT	450	[2]
bla _{SPM}	F: AAAATCTGGGTACGCCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	[4]
bla _{AIM}	F: CTGAAGGTCTACGGAAACAC R: GTTCGGCCACCTCGAATTG	322	[4]
bla _{GIM}	F: TCGACACACCTTGGTCTGAA R: AACTTCCAACCTTGGCCATGC	477	[4]
bla _{DIM}	F: GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG R: CGTTCGGCTGGATTGATTTG	699	[4]
bla _{SIM}	F: TACAAGGGATTCCGGCATCG R: TAATGGCCTGTCCCATGTG	570	[4]
bla _{GES}	F: GTTTTGCAATGTGCTCAACG R: TGCCATAGCAATAGCCGTAG	371	[5]
bla _{OXA-48}	F: TTGGTGCCATCGATTATCGG R: GAGCACTTCTTTGTGATGGC	744	[6]

1.6 ERIC-PCR ERIC-1 引物序列为: 5'-ATGTA-AGCTCCTGGGGATTAC-3', ERIC-2 引物序列为: 5'-AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG-3', 由上海生工公司合成, 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、50 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min、72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min、30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 凝胶成像系统观察纪录结果。结果判断: 将电泳图谱条带位置相同的菌株视为同一型别。

1.7 统计学处理 药敏试验结果参照 CLSI 2018 标准进行判读, 使用 WHONET 5.4 软件对细菌数据进行统计分析。

2 结果

2.1 菌株基本资料 5 年间 CREC 的检出率分别为 1.00% (12/1198)、1.12% (14/1247)、1.01% (13/1287)、1.22% (15/1230)、1.50% (17/1130), 71 株 CREC 主要来自尿液 29 株, 其次为痰液 15 株, 分泌物 10 株, 血液 5 株; 穿刺液、创面、腹水、引流液各 2 株; 胆汁、脑脊液、脓液和咽拭子均为 1 株。病区来源以 ICU 和烧伤科为主, 分别为 8 株和 7 株, 其次为泌尿外科、门诊各 5 株; 肝胆外科、感染科、急诊内科和康复科各 4 株; 干部病房、神经外科、血液

科和肿瘤科各 3 株; 风湿科、呼吸科、神经内科、肾内科、胃肠外科、消化科和心脏外科各 2 株; 产科、新生儿科、内分泌科和皮肤科各 1 株。

2.2 药物敏感性结果 71 株 CREC 对常见抗菌药物的耐药率普遍居高, 见表 2。

表 2 71 株 CREC 对常见抗菌药物的耐药率

抗菌药物	耐药株数	耐药率(%)
氨苄西林	71	100.00
氨苄西林/舒巴坦	71	100.00
头孢唑林	71	100.00
头孢替坦	68	95.77
头孢他啶	71	100.00
头孢曲松	71	100.00
头孢吡肟	71	100.00
氟康唑	71	100.00
头孢哌酮/舒巴坦	62	87.32
哌拉西林/他唑巴坦	68	95.77
亚胺培南	69	97.18
美罗培南	68	95.77
厄他培南	68	95.77
复方新诺明	55	77.46
左氧氟沙星	64	90.14
环丙沙星	62	87.32
阿米卡星	22	30.99
庆大霉素	48	67.61
妥布霉素	34	47.89

2.3 表型试验结果 71 株 CREC 中 45 株 MHT 阳性, 67 株 mCIM 阳性, 69 株 Carba NP 阳性, 阳性率分别为 63.38%、94.37%、97.18%。部分阳性结果见图 1~3。



图 1 部分菌株 MHT 试验结果

阳性对照: 1705 即肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705; 阴性对照: 1706 即肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1706; 21: 编号 21 的 CREC (MHT 阳性)



图 2 部分菌株 mCIM 试验结果

阳性对照: ATCC 1705 即肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705; 阴性对照: ATCC 1706 即肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1706; 9、12: 编号 9、12 的大肠埃希菌 (mCIM 阳性)

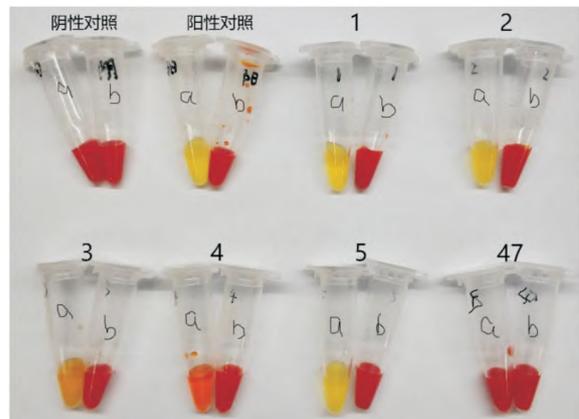


图 3 部分菌株 Carba NP 试验结果

阳性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705; 阴性对照: 肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1706; 1~5: Carba NP 试验阳性菌株; 47: Carba NP 试验阴性菌株

2.4 耐药基因 PCR 扩增结果 71 株 CREC 共有 43 株检出碳青霉烯酶基因, 检出率为 60.56%, 34 株携带 bla_{NDM} 中有 7 株为 bla_{NDM-1} 27 株为 bla_{NDM-5} 9 株携带 bla_{KPC} 均为 bla_{KPC-2}。其余碳青霉烯酶基因 bla_{BIC}、bla_{IMP}、bla_{SPM}、bla_{AIM}、bla_{GIM}、bla_{DIM}、bla_{SIM}、bla_{GES}、bla_{OXA-48} 均未检出。部分碳青霉烯酶基因电泳图谱见图 4。

2.5 ERIC-PCR 结果 71 株 CREC 的 ERIC-PCR 电泳图谱产生 2~8 条不同的条带模式, 范围从 100~2 000 bp, 共分为 19 个型别, 其中 A 型 9 株, B 型 8 株, C 型 7 株, D 型 6 株, E 型 6 株, F 型 5 株, G 型 5 株, H 型 4 株, I 型 4 株, J 型 4 株, K 型 3 株, L 型 2

株 M 型 2 株 N 型、O 型、P 型、Q 型、R 型、S 型各 1 株。部分菌株 ERIC-PCR 电泳图谱见图 5。

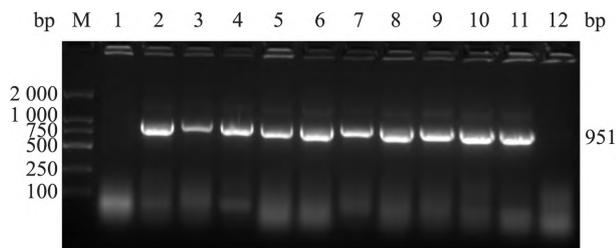


图 4 部分 bla_{NDM} 阳性电泳图谱

M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3 ~ 11: bla_{NDM} 阳性菌株; 12: bla_{NDM} 阴性菌株

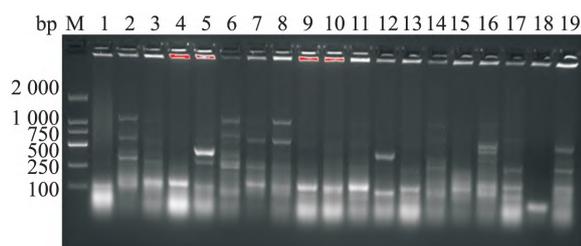


图 5 部分菌株 ERIC-PCR 电泳图谱

M: DNA Marker; 2、3、6、8、11、14: B 型; 1、4、9、10、13、15: C 型; 18: A 型; 16: D 型; 19: E 型; 17: G 型; 7: K 型; 5: M 型; 12: P 型

3 讨论

近年来 随着碳青霉烯类药物的广泛使用 耐碳青霉烯肠杆菌科细菌 (carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE) 在世界范围内越来越普遍。中国细菌耐药性监测网 CHINET 监测结果^[6] 显示大肠埃希菌对亚胺培南的耐药率由 2014 年的 0.9% 上升到 2019 年的 2.0%。另外 CRE 感染往往会引起较高的死亡率, Tamma et al^[7] 研究发现 32% 的 CRE 血液感染患者在 14 d 内死亡, 因此, 防控 CRE 的产生和传播意义重大。

5 年间, 本院 CREC 的检出率基本维持在低位水平, 平均为 1.17%, 且分离至不同年份不同科室, ICU 和烧伤科来源的菌株数量略高于其他科室, 可能与这两个科室的患者病情常较重, 大量抗生素的使用和进行过侵袭性操作有关。本研究中, 尿液标本分离的 CREC 高于其他样本类型, 与 Tian et al^[8] 研究结果一致, 这对临床医师治疗泌尿道感染提出了严峻的挑战, 由于氨基糖苷类、喹诺酮类和碳青霉烯类药物通常用于治疗泌尿系统感染, 而 CREC 对这几类药物往往表现出较高的耐药性。

到目前为止, CLSI 先后推荐了 MHT、Carba NP

和 mCIM 作为碳青霉烯酶的表型筛选实验。MHT 操作简单且成本低廉, 对流行广泛的 KPC 具有很好的检测能力, 但对新德里金属-β-内酰胺酶 (NDM)、粘质沙雷菌型碳青霉烯酶 (SME) 和苯唑西林酶 (OXA) 的敏感性较低^[9]。Carba NP 通过测量细菌提取物对亚胺培南的体外水解情况来检测碳青霉烯酶, Carba NP 对大多数碳青霉烯酶具有较好的敏感性, 然而, 在检测相对较弱的 OXA 型碳青霉烯酶时存在一定的局限^[10]。mCIM 是 2017 年 CLSI 推荐的一种用于筛选碳青霉烯酶表型的新型试验, 有研究^[11] 表明 mCIM 筛选肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶具有较高的特异性和敏感性。本研究中, 34 株产 NDM 的菌株只有 22 株 MHT 阳性, 说明 MHT 对 NDM 型碳青霉烯酶的检测能力有限。71 株 CREC, mCIM 阳性 67 株, 阳性率 94.4%, 略低于闫玲等^[12] 报道的阳性率 100%。Carba NP 阳性 69 株, 仅有 2 株阴性, 虽然 Carba NP 具有很好的检测效能, 但是所需试剂准备繁琐、保质期较短, 大规模流行病学筛查远比实验室小样本检测更能体现其优势。

产 NDM 细菌发现之初被称为“超级细菌”, 可见其耐药情况严重, NDM 能够水解几乎所有的 β-内酰胺类抗生素, 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌是 bla_{NDM} 的主要携带者。目前世界范围内均发现 NDM 阳性菌株, 尤以印度次大陆、中东和巴尔干地区的流行率最高^[13]。一项关于 CRE 在国内流行情况的研究^[14] 显示 25 个省、直辖市中, 除北京、上海和四川外, NDM 是 CREC 最常见的碳青霉烯酶。本研究中 43 株 CREC 检出耐碳青霉烯基因 34 株 (34/43, 79%) 携带 bla_{NDM} 9 株 (9/34, 21%) 携带 bla_{KPC-2}, 提示 bla_{NDM} 是本院 CREC 主要携带的碳青霉烯酶基因, 与全国绝大多数地区相一致。

ERIC-PCR 是一种可靠、快速的基因分型方法, 目前已广泛应用于细菌的流行病学研究。本研究使用该技术对 71 株 CREC 之间的遗传相关性进行研究, CREC 被分为 A-S 共 19 个型别, 没有发现优势型别, 相同型别菌株所属科室较为分散, 且分离年份未见集中现象。说明本院流行的 CREC 基因多态性较高, 以散发为主。

参考文献

- [1] Dagher C, Salloum T, Alousi S, et al. Molecular characterization of Carbapenem resistant *Escherichia coli* recovered from a tertiary hospital in Lebanon [J]. PLoS One 2018, 13 (9): e0203323.
- [2] 李思耐. 碳青霉烯类肠杆菌科耐药机制及分子诊断研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.

- [3] 钟太清. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌耐药性分析及分子特征研究[D]. 青岛: 青岛大学 2018.
- [4] Poirel L, Walsh T R, Cuivillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, 70(1): 119–23.
- [5] 蒋沁炆. 耐碳青霉烯类大肠埃希菌的耐药机制及其同源性分析[D]. 南昌: 南昌大学 2018.
- [6] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019年CHINET三级医院细菌耐药性监测[J]. *中国感染与化疗杂志* 2020, 20(3): 233–43.
- [7] Tamma P D, Goodman K E, Harris A D, et al. Comparing the outcomes of patients with carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae bacteremia [J]. *Clin Infect Dis* 2017, 64(3): 257–64.
- [8] Tian X, Zheng X, Sun Y, et al. Molecular mechanisms and epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolated from Chinese patients during 2002–2017 [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 501–12.
- [9] Al-Zahrani I A. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenge [J]. *Saudi Med J* 2018, 39(9): 861–72.
- [10] 董大光, 王健, 潘亚萍, 等. 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的检测及基因型分析[J]. *安徽医科大学学报* 2018, 53(11): 1721–5.
- [11] Tsai Y M, Wang S, Chiu H C, et al. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. *BMC Microbiol* 2020, 20(1): 315.
- [12] 闫玲, 翟菁华, 顾兵, 等. mCIM法检测产碳青霉烯酶菌株的性能评价[J]. *中华检验医学杂志* 2018, 41(4): 321–23.
- [13] Wu W, Feng Y, Tang G, et al. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00115–8.
- [14] Zhang R, Liu L, Zhou H, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China [J]. *Ebiomedicine* 2017, 19: 98–106.

Molecular characteristics and homology analysis of carbapenem-resistant *Escherichia coli*

Huang Jiexiang^{1,2}, Wang Zhongxin¹, Pan Yaping¹, Xu Yuanhong¹

¹Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of USTC(Anhui Provincial Hospital), Hefei 230001]

Abstract Objective To study the resistance characteristics, carbapenemase genotypes and the homology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* (CREC). **Methods** 6 092 *Escherichia coli* isolated from clinical specimens in The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University were collected and 71 strains of CREC were selected. The identification and antimicrobial susceptibility test were carried out by Vitek-2 Compact. Confirmation of carbapenemase phenotype was performed by modified hodge test (MHT), modified carbapenem inactivation method (mCIM) and carbapenemase nordmann-poirel (Carba NP) test. Carbapenemase-encoding genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, etc.) were identified by PCR and positive amplification products were sequenced, and then analyzed by using BLAST programs. ERIC-PCR fingerprinting was used to determine the clonal relationship between the different strains. **Results** CREC strains were mainly distributed in intensive care unit (ICU) and burn department, and the source of specimens was mainly urine. The drug susceptibility results showed that the resistance rates of CREC to ciprofloxacin, levofloxacin and cotrimoxazole were all above 70%, and the resistance rates to amikacin and tobramycin were less than 50%. Among 71 CREC strains, the number of positive strains for MHT, mCIM and Carba NP were 45, 67 and 69, and the positive rates were 63.38%, 94.37% and 97.18%, respectively. Carbapenemase genes were detected in 43 CREC isolates, of which 34 strains (79.07%, 34/43) carried *bla*_{NDM}, 9 strains (20.93%, 9/43) carried *bla*_{KPC-2}. In addition, the rates of strains harbored *bla*_{NDM-1} or *bla*_{NDM-5} were 20.59% (7/34) and 79.41% (27/34), respectively. Other carbapenem genes such as *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} and *bla*_{OXA-48} were not detected. According to the fingerprint of ERIC-PCR, CREC was divided into 19 genotypes A-S, and no dominant genotype was found. **Conclusion** Drug resistance rate of clinically isolated CREC in our hospital is high, showing multi-drug resistance. *bla*_{NDM} is the main carbapenemase gene of CREC. The epidemic CREC in our hospital has high genetic diversity and the homology of CREC is dispersive.

Key words *Escherichia coli*; Carbapenemases; homology; molecular characteristics